

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 387—390, September 1971

## Freie Fettsäuren im Serum

### II. Einfluß verschiedener Lagerungstemperaturen und Normalwerte

Von J. S. BRAUN<sup>1)</sup>

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce)  
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 19. Februar 1971)

Es wurde die Abhängigkeit der Konzentration an freien Fettsäuren im Serum von verschiedenen Lagerungstemperaturen überprüft. Bei tiefgefrorenen Seren konnte über 8 Monate keine Veränderung der freien Fettsäuren festgestellt werden. Läßt man Seren bei Raumtemperatur stehen, dann erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg der freien Fettsäuren; bei einigen Seren war jedoch anfänglich ein Abfall der Konzentration festzustellen. Bei Seren mit erhöhtem Neutralfett-Gehalt werden schon innerhalb der ersten Stunden teilweise erhebliche Mengen von Fettsäuren freigesetzt.

Anhand eines gemischten Normalkollektivs wurden die Normalwerte für die freien Fettsäuren im Serum festgelegt. Ein geschlechtsabhängiger Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Beim weiblichen Geschlecht nahm die Konzentration der freien Fettsäuren mit steigendem Lebensalter zu; unter Ovulationshemmern veränderte sich die Konzentration nicht.

#### *Free fatty acids in serum. II, The effect of different storage temperatures and the determination of normal values*

The effect of different storage temperatures on the concentration of free fatty acids in serum was tested. In sera deeply frozen for 8 months, there was no detectable change in the fatty acids. In sera stored at room temperature, there was a continuous increase in the free fatty acids; in some sera, however, there was an initial decrease in the concentration of fatty acids. In sera with increased concentrations of neutral fat, considerable amounts of fatty acids were released during the first hours of storage.

The normal values for free fatty acids in serum were determined on a mixed normal collective. No sex-dependent differences were found. In females, the concentration of free fatty acids increased with age and the concentrations were not affected by inhibitors of ovulation.

Die freien Fettsäuren im Serum, die als Mobilisationsprodukte aus den Gewebslipiden eine zentrale Stellung im Energiestoffwechsel einnehmen (1), machen nur 4–5% der Gesamtfettsäuren im Serum aus (2, 3). Durch die in vitro-Lipolyse bei Inkubation des Serums bei 37° steigt die Konzentration an freien Fettsäuren erheblich an (1). Für die Bestimmung der freien Fettsäuren ist es deshalb von Bedeutung, das Serum bei Temperaturen aufzubewahren, bei denen keine zusätzlichen Fettsäuren mehr freigesetzt werden. Die Untersuchungen hierüber von FORBES (4), HOWORTH (5) und BROECHOVEN (6) sind widersprüchlich.

Über die Normalwerte der freien Fettsäuren finden sich in der Literatur nur spärliche und divergierende Angaben; Mitteilungen über geschlechts- und altersabhängige Unterschiede fehlen völlig. Es erschien uns deshalb wichtig, einerseits das Verhalten der freien Fettsäuren bei verschiedenen Lagerungstemperaturen zu überprüfen, und zum anderen aus einem größeren gemischten Kollektiv die Normalwerte festzulegen.

#### Material und Methode

Die Verwendung von Serum (3, 18) anstelle von Plasma (1, 7) erfolgte aus technischen Gründen (vereinfachte Blutentnahme; Vereinheitlichung des Ausgangsmaterials für klinisch-chemische Analysen), nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß der Gehalt an freien Fettsäuren im Serum und im Plasma gleich ist. Für alle Analysen wurden nur Nüchternseren verwandt; die Blutentnahmen wurden im Laufe des frühen Vormittags vor-

genommen. 15 Min. nach der Entnahme wurden die Proben zentrifugiert und die Seren abgehebert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Seren kühl aufbewahrt.

Die jeweils erste Extraktion der Seren, die für die unterschiedliche Lagerung vorgesehen waren, erfolgte 90–120 Min. nach der Blutentnahme. Die Seren wurden dann bei folgenden Temperaturen aufbewahrt:

bei Raumtemperatur	— bis zu 50 Stunden
bei + 4°	— bis zu 6 Wochen
bei – 20°	— bis zu 8 Monaten.

Die tiefgefrorenen Proben wurden entweder in Einzelportionen aufbewahrt, so daß die einzelnen Proben bis zur Analyse permanent eingefroren blieben, oder als ein Pool, der bis zu 16mal aufgetaut und wieder eingefroren wurde.

Die Seren für die Normalwertbestimmung stammten von 328 normgewichtigen Personen aus verschiedenen Berufsschichten, die klinisch gesund waren, und deren klinisch-chemische Laborwerte unauffällig waren. Die Seren wurden 4–5 Stdn. nach Blutentnahme bei minus 20° eingefroren und erst zur Bestimmung der freien Fettsäuren wieder aufgetaut. Die freien Fettsäuren wurden titrimetrisch nach der Methode von TROUR (7) in der von uns angegebenen Modifikation (8) bestimmt. Die Neutralfette wurden enzymatisch nach EGGSTEIN (9, 10) über Glycerid-Glycerin ermittelt (Boehringer-Testkombination). Die Überprüfung der Normal- bzw. Lognormalverteilung und die Berechnung der verschiedenen statistischen Kennzahlen erfolgte nach den Angaben von SACHS (11). Zur Beurteilung der Signifikanz der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der Homogenitätstest nach KOLMOGOROFF und SMIRNOFF (11) eingesetzt. Falls nicht anders angegeben, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

#### Ergebnisse

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Veränderungen der Konzentrationen freier Fettsäuren in normalen und lipämischen Seren bei Raumtemperatur dargestellt. Da

<sup>1)</sup> Gegenwärtige Anschrift: Klinisch-chemische Abteilung der Urologischen Universitätsklinik, 6650 Homburg/Saar.

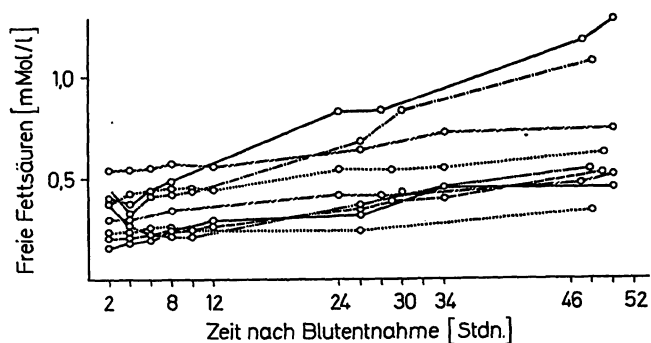


Abb. 1  
Konzentration freier Fettsäuren im Serum mit normalem Neutralfettgehalt; Aufbewahrung bei Raumtemperatur

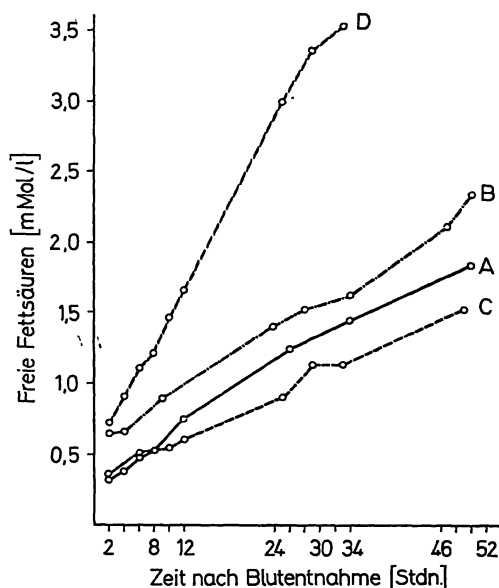


Abb. 2  
Konzentrationsänderung freier Fettsäuren im Serum mit erhöhtem Neutralfettgehalt (s. Text) bei Raumtemperatur

als Substrat für die in-vitro-Lipolyse in erster Linie Neutralfett zur Verfügung steht, wurde von jedem Serum der Ausgangswert der Neutralfette bestimmt. Bei den Normalseren lagen die Neutralfett-Konzentrationen zwischen 0,9 g/l und 1,45 g/l, für die lipämischen Seren wurden folgende Konzentrationen gemessen: Serum A 6,2 g/l; Serum B 12,9 g/l; Serum C 6,3 g/l; Serum D 30,6 g/l; Serum E 3,9 g/l.

Nicht bei allen Normalseren nimmt durch Stehenlassen innerhalb der ersten Stunden die Konzentration an freien Fettsäuren zu; vielmehr fällt bei zwei Seren innerhalb der ersten 8 Stunden der Gehalt an freien Fettsäuren bis zu 42% ab.

Der Anstieg liegt bei den übrigen Proben im gleichen Zeitraum nicht über 19% bis auf ein Serum mit 50%; dieser hohe Relativwert ist jedoch nicht repräsentativ, da die absolute Zunahme — bei einem Ausgangswert von 0,16 mMol/l — nur 0,08 mMol/l beträgt. Nach 24 bis 26 Stunden haben die freien Fettsäuren um 10 bis 100% zugenommen, nach 48 bis 50 Stunden um 50 bis 210%. Demgegenüber werden in lipämischen Seren schon innerhalb der ersten Stunden sehr viel mehr Fettsäuren freigesetzt. Nach 8 Stunden beträgt die Vermehrung der freien Fettsäuren 37 bis 69%, nach

24 bis 26 Stunden 115 bis 315% und nach 49 bis 51 Stunden 259 bis 458%, wobei die Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum D schon nach 33 Stunden und einer Zunahme um 400% beendet wurde.

In eingefrorenen Seren ändert sich die Konzentration freier Fettsäuren bis zu 8 Monaten nicht, selbst wenn die Tryglyceride vermehrt sind, wie es in Abbildung 3

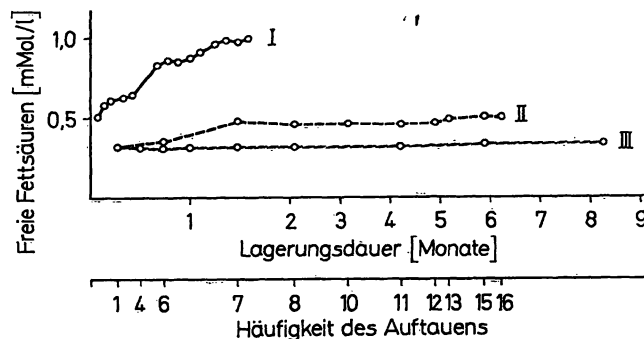


Abb. 3  
Konzentration freier Fettsäuren im Serum während der Aufbewahrung bei +4° (I); bei -20° ohne zwischenzeitliches Auftauen (III); bei -20° mit zwischenzeitlichem Auftauen (II)

für Serum E dargestellt ist. Ein leichter Anstieg ist jedoch festzustellen, wenn die Proben mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden (Abb. 3). Nach 16maligem Auftauen haben sich die freien Fettsäuren nur um 28% vermehrt. Wird die Aufbewahrungstemperatur von -20° auf +4° erhöht, dann kommt es zu einem stetigen Anstieg der freien Fettsäuren. Schon nach 2 Tagen beträgt die Zunahme 16%, nach 2 Wochen 28%, nach 6 Wochen hat die Konzentration um 100% zugenommen. Diese Werte gelten nur für Normalseren, bei lipämischen Seren werden die freien Fettsäuren stärker ansteigen entsprechend der Zunahme bei Raumtemperatur.

Die Normalwerte der freien Fettsäuren im Serum sind nicht symmetrisch-normal verteilt, sondern es liegen in allen Gruppen linksasymmetrische Verteilungen vor, wie es für das Gesamtkollektiv in der Abbildung 4

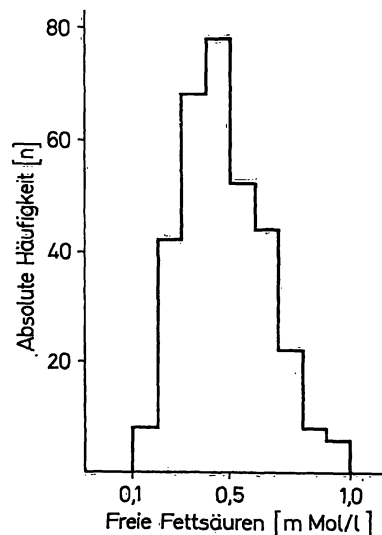


Abb. 4  
Häufigkeitsverteilung der freien Fettsäuren im Serum des normalen Gesamtkollektivs (n = 328)

Tab. 1  
Statistische Kennzahlen (s. Text) der freien Fettsäuren für das Gesamtkollektiv sowie für Männer und Frauen getrennt

	Gesamt-Kollektiv (n = 328)	Männliches Kollektiv (n = 49)	Weibliches Kollektiv Ohne Antikonceptiva (n = 217)	Weibliches Kollektiv mit Antikonceptiva (n = 62)
D (mMol/l)	0,425	0,381	0,424	0,445
$\bar{x}$ (mMol/l)	0,455	0,440	0,460	0,470
$\bar{x} \pm s$ (mMol/l)	0,474 $\pm$ 0,175	0,451 $\pm$ 0,136	0,478 $\pm$ 0,183	0,477 $\pm$ 0,175
Variationsbreite (mMol/l)	0,14—0,99	0,20—0,74	0,14—0,99	0,17—0,87
$\bar{x}_L$ (mMol/l)	0,476	0,452	0,480	0,480
90 %-Bereich (mMol/l)	0,299—0,650	0,315—0,590	0,296—0,663	0,298—0,659

Tab. 2  
Statistische Kennzahlen (s. Text) der freien Fettsäuren für das weibliche Kollektiv

	16—19 J. (n = 27)	20—29 J. (n = 99)	30—39 J. (n = 49)	40—49 J. (n = 21)	50 J. (n = 21)
D (mMol/l)	0,365	0,436	0,425	0,536	
$\bar{x}$ (mMol/l)	0,390	0,455	0,475	0,545	
$\bar{x} \pm s$ (mMol/l)	0,399 $\pm$ 0,133	0,472 $\pm$ 0,181	0,496 $\pm$ 0,188	0,546 $\pm$ 0,189	0,504 $\pm$ 0,207
Variationsbreite (mMol/l)	0,14—0,68	0,17—0,99	0,15—0,89	0,23—0,95	0,24—0,94
$\bar{x}_L$ (mMol/l)	0,402	0,473	0,501	0,549	0,510
90 %-Bereich (mMol/l)	0,258—0,546	0,297—0,646	0,300—0,699	0,358—0,738	0,295—0,721

dokumentiert ist. Infolgedessen fallen Dichtemittel, Median und Mittelwert nicht zusammen, sondern es gilt  $D < \bar{x} < \bar{x}_L$  (Tab. 1 u. 2). Die Verteilung der Summenhäufigkeiten der Meßwerte auf logarithmischem Wahrscheinlichkeitspapier ergibt für alle Gruppen eine annähernd gradlinige Tendenz; daraus ergibt sich, daß die Normalwerte der freien Fettsäuren lognormal verteilt sind. In den Tabellen 1 und 2 sind von den Kennzahlen der Lognormalverteilung der Mittelwert ( $\bar{x}_L$ ) und der zentrale 90%-Bereich angegeben.

Zwischen den Mittelwerten des weiblichen und männlichen Kollektivs bestehen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 1).

Unter Antikonceptiva ändern sich die freien Fettsäuren nicht, die Mittelwerte für die Gruppe mit Antikonceptiva und für die altersentsprechende Gruppe (19—30 J.) ohne Antikonceptiva sind weitgehend identisch. Auch die Art des Präparates beeinflusst die Konzentration an freien Fettsäuren nicht. Von den 62 Frauen nahmen 33 (Gruppe 1) ein Präparat mit niedrigem Östrogen- und Gestagenanteil (Eugynon) und 20 (Gruppe 2) verschiedene Präparate mit wechselnden Östrogen- und Gestagenanteilen (Aconcen, Anovlar, Etalontin, Lyndiol, Noracyclin und Ovulen), bei den restlichen 9 Frauen war das Präparat nicht mehr zu eruieren. In der Gruppe 1 beträgt der Mittelwert der Lognormalverteilung 0,480 mMol/l und in der Gruppe 2 0,479 mMol/l, die 90%-Bereiche liegen zwischen 0,284 und 0,673 mMol/l bzw. zwischen 0,303 und 0,653 mMol/l.

Mit zunehmendem Lebensalter steigen bei weiblichem Geschlecht die freien Fettsäuren kontinuierlich an, allerdings besteht ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$  nur zwischen den Altersgruppen 16—19 Jahre und 40—49 Jahre. Die übrigen Unterschiede sind im Homogenitätstest nicht signifikant.

Wegen der geringen Fallzahl war es nicht möglich, das männliche Kollektiv in Altersgruppen aufzuteilen, wie es für das weibliche geschehen ist.

### Diskussion

Läßt man Serum bei Raumtemperatur stehen, dann kommt es zur Freisetzung von Fettsäuren aus Esterverbindungen und zu einer Zunahme der freien Fettsäuren. Verantwortlich für diese Lipolyse sind sowohl enzymatische als auch physiko-chemische Faktoren (1, 4). Deshalb hat DOLE (1) darauf hingewiesen, Plasma möglichst bald zu extrahieren. Allerdings ist bei Normalseren der Anstieg innerhalb der ersten Stunden nach Entnahme gering; er ist weniger stark ausgeprägt, als FORBES (4) und BROECHOVEN (6) aus ihren Analysen 24 Stunden nach Blutentnahme folgerten. Die Ursachen für die Abnahme der Konzentration freier Fettsäuren bei einigen Seren innerhalb der ersten 8 Stunden sind nicht geklärt; bei späteren Kontrollbestimmungen von Seren derselben Probanden war diese Verminderung reproduzierbar, sie kann also kein Zufallsbefund oder methodisch bedingt sein. Möglicherweise bilden die freien Fettsäuren unter bestimmten nicht bekannten Bedingungen schwerlösliche Erdalkalisalze, die dann nicht mehr extrahierbar sind. Mit steigender Konzentration an Neutralfett, das als wesentliches Substrat für die Fettsäurefreisetzung anzusehen ist, steigen die freien Fettsäuren im Serum schon innerhalb der ersten Stunden nach Blutentnahme rapide an (Abb. 2).

Auch bei +4° werden im Verlauf mehrerer Wochen Fettsäuren freigesetzt (Abb. 3), während BROECHOVEN (6) bei dieser Temperatur keine Zunahme der freien Fettsäuren feststellen konnte.

In Seren, die kontinuierlich bei -20° aufbewahrt werden, findet nach unseren Ergebnissen, die sich mit denen von BROECHOVEN (6) decken, keine Lipolyse statt, auch nicht bei vermehrtem Neutralfett-Gehalt;

Tab. 3  
Titrimetrisch bestimmte Normalwerte der freien Fettsäuren

Autor	Methode	Geschlecht/Alter	Normalkollektiv $\bar{x} \pm s$ (mmol/l)
SVANBORG (12)	SVANBORG (12)	gem./19—57 J.	0,690 $\pm$ 0,188
SANDHOFEN (13)	DOLE (19)	gem./46,9 $\pm$ 18 J.	0,617 $\pm$ 0,205
WYNN (14)	DOLE (19)	weibl./—	0,654 $\pm$ 0,191
GEYER (15)	DOLE (19)	gem./17—74 J.	0,656 $\pm$ 0,192
NIESCHLAG (16)	DOLE (19)	gem./16—32 J.	0,613 $\pm$ 0,143
HARLAN (17)	TROUT (7)	—	0,471 $\pm$ 0,091
LIEBHARDT (18)	TROUT (7)	junge Männer	0,445 $\pm$ 0,175

über 8 Monate blieb der Gehalt an freien Fettsäuren konstant. Demgegenüber stehen Untersuchungen von FORBES (4) und HOWORTH (5). Während FORBES (4) in eingefrorenen Seren eine stetige Zunahme der freien Fettsäuren fand, stellte HOWORTH (5) eine Abnahme fest. Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse halten wir es aufgrund unserer eigenen Analysen für zulässig, Seren, die nicht sofort nach Blutentnahme extrahiert werden, kurzfristig bei +4° zu lagern oder bei -20° tiefzufrieren. Im eingefrorenen Zustand sind die Seren ohne Änderung der Konzentration an freien Fettsäuren lange Zeit haltbar.

Ein Vergleich der von uns ermittelten Normalwerte mit denen anderer Autoren setzt das gleiche methodische Prinzip voraus, nämlich die Titration der Fettsäuren. Hierbei werden alle extrahierten Fettsäuren bestimmt, während bei kolorimetrischen Verfahren bevorzugt Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>10</sub> bis C<sub>18</sub> erfaßt werden (20), und die als Standard meist verwandte Palmitinsäure nicht genau die gleichen Ergebnisse ergibt wie die Gruppe der gemischten Serum-Fettsäuren (21). Aber auch bei den von anderen Autoren titrimetrisch ermittelten Normalwerten, über die keine Angaben zum Verteilungstyp vorliegen, zeigen sich erhebliche Unterschiede (Tab. 3).

Die nach TROUT (7) bestimmten Werte liegen tiefer als die nach anderen Autoren bestimmten, sie stimmen mit den von uns ermittelten Normalwerten für das Gesamtkollektiv überein. Die Differenzen von 0,2 mmol/l und mehr erklären sich — teilweise jedenfalls — aus

der Unspezifität der DOLESchen Methode, bei der neben freien Fettsäuren auch kurzkettige aliphatische Säuren (Milch-, Brenztrauben-, Essigsäure) extrahiert und titriert werden.

Da mit der Modifikation nach TROUT (7) diese Säuren weitgehend entfernt werden, entsprechen die titrierten Säureäquivalente ausschließlich den freien Fettsäuren (7, 8, 22).

Aus der Unterteilung des Normwertkollektivs ergibt sich:

1. Zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht besteht kein Unterschied in der Konzentration freier Fettsäuren im Serum.
2. Beim weiblichen Geschlecht nehmen die freien Fettsäuren im Serum mit steigendem Lebensalter kontinuierlich zu, die Unterschiede sind aber nur teilweise signifikant. (Für das männliche Geschlecht konnte eine altersmäßige Aufteilung wegen des geringen Stichproben-Umfangs nicht vorgenommen werden.)
3. Bei Einnahme von Ovulationshemmern wird die Konzentration an freien Fettsäuren im Serum nicht verändert; zum gleichen Ergebnis kommt auch KAFFARNIK (23) und LEHNERT (24), während WYNN (14) eine signifikante Zunahme der freien Fettsäuren im Serum feststellt.

Fräulein K. OLBRICH und Frau PIEPENHAGEN danke ich für gewissenhafte Mitarbeit.

## Literatur

1. DOLE, V. P., J. Clin. Invest. 35, 150 (1956). — 2. WAREMBOURG, H., G. BISERTE, J. JAILLARD, J. GUIDOLLET-THEVENOT, G. SEZILLE und M. BERTRAND, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 14, 710 (1966). — 3. EGGSTEIN, M., Dtsch. med. Journal 19, 12 (1968). — 4. FORBES, A. L. und J. A. CAMLIN, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y. 102, 709 (1959). — 5. HOWORTH, P. J. N., S. GIBBARD und V. MARKS, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 14, 69 (1966). — 6. BROECHOVEN, CH. und J. PARIJS, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 20, 530 (1968). — 7. TROUT, D. L., E. H. ESTERS jr. und S. J. FRIEDBERG, J. Lipid Res. 1, 199 (1959). — 8. BRAUN, J. S., diese Z., 9, 383 (1971). — 9. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, Klin. Wschr. 44, 262 (1966). — 10. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, Klin. Wschr. 44, 267 (1966). — 11. SACHS, L., Statistische Auswertungsmethoden, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968). — 12. SVANBORG, A. und L. SVENNERHOLM, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 3, 443 (1958). — 13. SANDHOFER, F., S. SAILER und H. BRAUNSTEINER, Klin. Wschr. 44, 433 (1966). — 14. WYNN, V. und J. W. H. DOAR, Lancet, London 1966/II, 715. — 15. GEYER, G., B. SOKOPP, K. H. TRAGL und A. BERINGER, Zschr. exper. Med. 150, 139 (1969). — 16. NIESCHLAG, E., G. J. KREMER und U. MUSSGNUNG, Klin. Wschr. 48, 381 (1970). — 17. HARLAN, W. R., J. LASZLO, M. D. BOGDONOFF und E. H. ESTERS jr., J. Clin. Endocr., Springfield 23, 33 (1963). — 18. LIEBHARDT, E. und J. G. GOSTOMZYK, diese Z. 6, 377 (1968). — 19. DOLE, V. P. und H. MEINERTZ, J. biol. Chemistry 235, 2595 (1960). — 20. DUNCOMBE, W. G., Biochem. J. 88, 7 (1963). — 21. DUNCOMBE, W. G., Clin. Chim. Acta, Amsterdam 9, 122 (1964). — 22. PARIJS, J., F. BARBIER und A. ELEWAUT, Clin. Chem., (New York) 12, 767 (1966). — 23. KAFFARNIK, H., H. LEHNERT, J. G. MEYER-BERTENRATH, P. ZÖFEL und R. KARSZNIA, Klin. Wschr. 48, 439 (1970). — 24. LEHNERT, H., J. SCHNEIDER, W.-D. GASSEL, P. ZÖFEL, R. KARSZNIA, J. G. MEYER-BERTENRATH und H. KAFFARNIK, Klin. Wschr. 49, 280 (1971).

Dr. J. S. Braun  
Klin.-chem. Abt. d. Urologischen Universitätsklinik  
6650 Homburg/Saar